

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年 6月11日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-175175

出 願 人

Applicant(s):

住友化学工業株式会社

2001年10月19日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造

出証番号 出証特2001-3091236

【書類名】 特許願

【整理番号】 P152929

【提出日】 平成13年 6月11日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 9/02  
C12N 15/53  
C12P 7/62

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社  
社内

【氏名】 朝子 弘之

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社  
社内

【氏名】 清水 将年

【特許出願人】

【識別番号】 000002093

【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100093285

【弁理士】

【氏名又は名称】 久保山 隆

【電話番号】 06-6220-3405

【選任した代理人】

【識別番号】 100094477

【弁理士】

【氏名又は名称】 神野 直美

【電話番号】 06-6220-3405

【選任した代理人】

【識別番号】 100113000

【弁理士】

【氏名又は名称】 中山 亨

【電話番号】 06-6220-3405

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010238

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9903380

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 還元酵素遺伝子及びその利用

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の塩基配列のいずれかを有することを特徴とする遺伝子。

- a) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列をコードする DNA の塩基配列。
- b) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA の塩基配列であって、かつ、4-ブロモ-3-オキソ酪酸メチルを不斉還元して (S)-4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルを優先的に生産する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列。
- c) 配列番号 2 で示される塩基配列。

【請求項 2】

宿主内において機能可能なプロモーターと請求項 1 に記載の遺伝子とが機能可能な形で接続されてなる遺伝子。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の遺伝子を含むことを特徴とする組換えベクター。

【請求項 4】

請求項 3 に記載のベクターにより形質転換されたことを特徴とする形質転換体。

【請求項 5】

宿主が微生物である請求項 4 に記載の形質転換体。

【請求項 6】

宿主が大腸菌である請求項 4 に記載の形質転換体。

【請求項 7】

請求項 3 に記載の組換えベクターを宿主細胞に導入する工程を含むことを特徴とする形質転換体の製造方法。

【請求項 8】

以下のアミノ酸配列のいずれかを有することを特徴とするタンパク質。

- a) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列。
- b) 配列番号 2 で示される塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA の塩基配列がコードするアミノ酸配列であって、かつ、4-ブロモ-3-オキソ酪酸メチルを不斉還元して (S)-4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルを優先的に生産する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列。
- c) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、4-ブロモ-3-オキソ酪酸メチルを不斉還元して (S)-4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルを優先的に生産する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列。

【請求項 9】

4-ハロ-3-オキソ酪酸エステルに請求項 8 に記載のタンパク質、それを産生する形質転換体又はその処理物を作用させることを特徴とする (S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の遺伝子及び酸化型  $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリジン酸を還元型に変換する能力を有する酵素をコードする遺伝子を有することを特徴とする組換えベクター。

【請求項 11】

酸化型  $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリジン酸を還元型に変換する能力を有する酵素がグルコース脱水素酵素である請求項 10 に記載の組換えベクター。

【請求項 12】

請求項 10 又は 11 に記載のベクターにより形質転換されたことを特徴とする形質転換体。

【請求項 13】

宿主が微生物である請求項 12 に記載の形質転換体。

【請求項 14】

宿主が大腸菌である請求項 12 に記載の形質転換体。

## 【請求項 1 5】

酸化型  $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸を還元型に変換する能力を有する酵素を共存させること特徴とする請求項 9 に記載の (S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法。

## 【請求項 1 6】

酸化型  $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸を還元型に変換する能力を有する酵素が、グルコース脱水素酵素によって行われる請求項 1 5 に記載の (S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造法。

## 【請求項 1 7】

4-ハロ-3-オキソ酪酸エステルに請求項 1 2 ~ 1 4 に記載の形質転換体又はその処理物を作用させることを特徴とする (S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0 0 0 1】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、還元酵素タンパク質をコードする遺伝子、該タンパク質及びその用途に関する。

## 【0 0 0 2】

## 【従来の技術】

(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルは医薬中間体等として有用な化合物であり、これまでに種々の製造法が提案されている。

## 【0 0 0 3】

## 【発明が解決しようとする課題】

しかし、従来の (S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造法は必ずしも工業的に十分なものではなく、新しい (S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造法が求められている。

本発明の目的は、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを製造する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子を見出し、これを利用した 4-ハロ-3-オキソ酪酸エステルを不斉還元して (S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪

酸エステルの新規な製造法を提供することである。

【 0 0 0 4 】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造法について種々検討した結果、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質が4-ハロ-3-オキソ酪酸エステルを不斉還元し、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを優先的に生産する能力を有することを見出し、本発明を完成した。

【 0 0 0 5 】

即ち、本発明は下記の(1)～(17)の発明を提供する。

【 0 0 0 6 】

(1) 下記の塩基配列のいずれかを有することを特徴とする遺伝子。(以下、本発明遺伝子と記す。)

a) 配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列。

b) 配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列であって、かつ、4-ブロモ-3-オキソ酪酸メチルを不斉還元して(S)-4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルを優先的に生産する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列。

c) 配列番号2で示される塩基配列。

【 0 0 0 7 】

(2) 宿主内において機能可能なプロモーターと前項(1)に記載の遺伝子とが機能可能な形で接続されてなる遺伝子。

【 0 0 0 8 】

(3) 前項(1)又は(2)に記載の遺伝子を含むことを特徴とする組換えベクター。(以下、本発明組換えベクターと記す。)

【 0 0 0 9 】

(4) 前項(3)に記載のベクターにより形質転換されたことを特徴とする形質転換体。

【 0 0 1 0 】

(5) 宿主が微生物である前項 (4) に記載の形質転換体。

【 0 0 1 1 】

(6) 宿主が大腸菌である前項 (4) に記載の形質転換体。

【 0 0 1 2 】

(7) 前項 (3) に記載の組換えベクターを宿主細胞に導入する工程を含むことを特徴とする形質転換体の製造方法。

【 0 0 1 3 】

(8) 以下のアミノ酸配列のいずれかを有することを特徴とするタンパク質（以下、本発明タンパク質と記す。）。

a) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列。

b) 配列番号 2 で示される塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA の塩基配列がコードするアミノ酸配列であって、かつ、4-ブロモ-3-オキソ酪酸メチルを不斉還元して (S)-4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルを優先的に生産する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列。

c) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、4-ブロモ-3-オキソ酪酸メチルを不斉還元して (S)-4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルを優先的に生産する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列。

【 0 0 1 4 】

(9) 4-ハロ-3-オキソ酪酸エステルに前項 (8) に記載のタンパク質、それを産生する形質転換体又はその処理物を作用させることを特徴とする (S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法。

【 0 0 1 5 】

(10) 前項 (1) に記載の遺伝子及び酸化型  $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸を還元型に変換する能力を有する酵素をコードする遺伝子を有することを特徴とする組換えベクター。

【 0 0 1 6 】



(11) 酸化型 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸を還元型に変換する能力を有する酵素がグルコース脱水素酵素である前項(10)に記載の組換ベクター。

【0017】

(12) 前項(10)又は(11)に記載のベクターにより形質転換されたことを特徴とする形質転換体。

【0018】

(13) 宿主が微生物である前項(12)に記載の形質転換体。

【0019】

(14) 宿主が大腸菌である前項(12)に記載の形質転換体。

【0020】

(15) 酸化型 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸を還元型に変換する能力を有する酵素を共存させる特徴とする(9)に記載の(S)-4-ハロー-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法。

【0021】

(16) 酸化型 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸を還元型に変換する能力を有する酵素が、グルコース脱水素酵素によるグルコースから $\delta$ -グルコノラクトンへの変換を利用することによって行われる前項(15)に記載の(S)-4-ハロー-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造法。

【0022】

(17) 4-ハロー-3-オキソ酪酸エステルに前項(12)～(14)に記載の形質転換体又はその処理物を作用させることを特徴とする(S)-4-ハロー-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法。

【0023】

【発明の実施の形態】

まず、本発明遺伝子について説明する。

本発明遺伝子は、天然の遺伝子であってもよく、又は天然の遺伝子に変異を導入(部位特異的変異導入法、突然変異処理等)することにより作出された遺伝子であってもよい。天然の遺伝子を検索する場合には、4-ブロモ-3-オキソ酪

酸メチルを不斉還元して (S) - 4 - ブロモ - 3 - ヒドロキシ酪酸メチルを優先的に生産する能力を有する微生物を対象にすればよく、例えばペニシリウム・シトリナム (*Penicillium citrinum*) などのペニシリウム属に属する微生物をその対象として挙げることができる。

## 【0024】

本発明遺伝子は 4 - ブロモ - 3 - オキシ酪酸メチルを不斉還元して (S) - 4 - ブロモ - 3 - ヒドロキシ酪酸メチルを優先的に生産する還元反応を触媒する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有している。

## 【0025】

本発明遺伝子において「配列番号 1 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA」とは、例えば「クローニングとシーケンス」（渡辺格監修、杉浦昌弘編集、1989 年、農村文化社発行）等に記載されているサザンハイブリダイゼーション法において、（１）高イオン濃度下〔例えば、6XSSC（900mM の塩化ナトリウム、90mM のクエン酸ナトリウム）が挙げられる。〕に、65℃でハイブリダイズさせることにより配列番号 1 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列からなる DNA と DNA-DNA ハイブリッドを形成し、（２）低イオン濃度下〔例えば、0.1 X SSC（15mM の塩化ナトリウム、1.5 mM のクエン酸ナトリウム）が挙げられる。〕に、65℃で 30 分間保温した後も該ハイブリッドが維持されうるような DNA をいう。

## 【0026】

具体的には、例えば、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる DNA、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列において、その一部の塩基配列が欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなる DNA、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる DNA と相同性が 80% 以上の DNA があげられる。かかる DNA は、自然界に存在する DNA の中からクローニングされた DNA であっても、このクローニングされた DNA に塩基の欠失、置換または付加が人為的に導入されてなる DNA であっても、人為的に合成された DNA であってもよい。

## 【 0 0 2 7 】

より具体的には例えば、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列からなる DNA 及び配列番号 2 で示される塩基配列を有する DNA（配列番号 2 で示される塩基配列からなる DNA、配列番号 2 8 で示される塩基配列からなる DNA 等）が挙げられる。

## 【 0 0 2 8 】

本発明遺伝子の DNA は例えば以下のようにして調製することができる。

## 【 0 0 2 9 】

ペニシリウム・シトリナム (*Penicillium citrinum*) 等のペニシリウム属に属する微生物等から通常の遺伝子工学的手法（例えば、「新 細胞工学実験プロトコール」（東京大学医科学研究所制癌研究部編、秀潤社、1993年）に記載された方法）に準じて cDNA ライブラリーを調製し、これらを鋳型として、かつ適切なプライマーを用いて PCR を行うことにより、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる DNA、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる DNA 及び／又は配列番号 2 で示される塩基配列を有する DNA 等を増幅して本発明遺伝子の DNA を調製することができる。

## 【 0 0 3 0 】

また、前記 cDNA ライブラリーを鋳型として、かつ配列番号 2 3 に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号 2 4 に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いて PCR を行うことにより、配列番号 2 8 で示される塩基配列からなる DNA を増幅して本発明遺伝子の DNA を調製することができる。

## 【 0 0 3 1 】

該 PCR の条件としては、例えば、4 種類の dNTP を各々 20  $\mu$ M、2 種類のオリゴヌクレオチドプライマーを各々 15 pmol、Taq polymerase を 1.3 U 及び鋳型となる cDNA ライブラリーを混合した反応液を 97°C（2 分間）に加熱した後、97°C（0.25 分間）- 50°C（0.5 分間）- 72°C（1.5 分間）のサイクルを 10 回、次いで 97°C（0.25 分間）- 55°C（0.5 分間）- 72°C（2.5 分間）のサイ

クルを20回行い、さらに72℃で7分間保持する条件が挙げられる。

【0032】

なお、該PCRに用いるプライマーの5'末端側には、制限酵素認識配列等を付加していてもよい。

【0033】

また、前記cDNAライブラリーを鋳型として配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列から選ばれる塩基配列を有するオリゴヌクレオチド等（例えば、配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする5'末端側の約14塩基程度以上の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド）とDNAライブラリー構築に用いられたベクターのDNA挿入部位近傍の塩基配列に相補的な塩基配列からなる約14塩基程度以上のオリゴヌクレオチドとをプライマーとして用いてPCRを行うことによって配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAや、配列番号1で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNA等を増幅して本発明遺伝子のDNAを調製することができる。

【0034】

上記のようにして増幅されたDNAを「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> edition」（1989），Cold Spring Harbor Laboratory Press、「Current Protocols in Molecular Biology」（1987），John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載されている方法に準じてベクターにクローニングして本発明組換えベクターを得ることができる。用いられるベクターとしては、具体的には、例えば、pUC119（宝酒造社製）、pTV118N（宝酒造社製）、pBluescriptII（東洋紡社製）、pCR2.1-TOPO（Invitrogen社製）、pTrc99A（Pharmacia社製）、pKK223-3（Pharmacia社製）などが挙げられる。

【0035】

また、本発明の遺伝子のDNAは例えばペニシリウム・シトリナム（*Penicillium citrinum*）等のペニシリウム属に属する微生物由来のベクターに挿入されたcDNAライブラリーに配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配

列の一部を有する約 1 5 塩基以上の塩基からなる DNA をプローブとして後述する条件にてハイブリダイズさせ、該プローブが特異的に結合する DNA を検出することによっても取得することができる。

## 【 0 0 3 6 】

染色体 DNA 又は c DNA ライブラリーにプローブをハイブリダイズさせる方法としては、例えばコロニーハイブリダイゼーションやブランクハイブリダイゼーションを挙げることができ、ライブラリーの作製に用いられたベクターの種類に応じて方法を選択することができる。

## 【 0 0 3 7 】

使用されるライブラリーがプラスミドベクターを用いて作製されている場合はコロニーハイブリダイゼーションを行う。具体的にはライブラリーの DNA を宿主微生物に導入して形質転換体を取得し、得られた形質転換体を希釈して寒天培地にまき、コロニーが現われるまで培養する。

## 【 0 0 3 8 】

使用されるライブラリーがファージベクターを用いて作製されている場合はブランクハイブリダイゼーションを行う。具体的には宿主微生物とライブラリーのファージとを感染可能な条件下で混合し、さらに軟寒天培地と混合し、これを寒天培地にまき、ブランクが現われるまで培養する。

## 【 0 0 3 9 】

次いで、いずれのハイブリダイゼーションの場合も、前記の培養を行った寒天培地の表面にメンブレンを載せ、形質転換体又はファージを該メンブレンに転写する。このメンブレンをアルカリ処理した後、中和処理し、次いで DNA を該メンブレンに固定する処理を行う。より具体的には例えばブランクハイブリダイゼーションの場合には、前記寒天培地上にニトロセルロースメンブレン又はナイロンメンブレン（例えば、Hybond-N<sup>+</sup>（アマシャム社登録商標））を置き、約 1 分間静置してファージ粒子をメンブレンに吸着させる。次に、該メンブレンをアルカリ溶液（例えば 1 . 5 M 塩化ナトリウム、0 . 5 M 水酸化ナトリウム）に約 3 分間浸してファージ粒子を溶解させてファージ DNA をメンブレン上に溶出させた後、中和溶液（例えば、1 . 5 M 塩化ナトリウム、0 . 5 M トリスー塩酸緩衝

溶液 pH 7.5) に約 5 分間浸す。次いで該メンブレンを洗浄液 (例えば 0.3 M 塩化ナトリウム、30 mM クエン酸、0.2 M トリス-塩酸緩衝液 pH 7.5) で約 5 分間洗った後、例えば約 80℃ に約 90 分間加熱することによりファージ DNA をメンブレンに固定する。

## 【0040】

このように調製されたメンブレンを用いて、上記 DNA をプローブとしてハイブリダイゼーションを行う。ハイブリダイゼーションは例えば J. Sambrook, E. F. Frisch, T. Maniatis 著「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> edition (1989)」Cold Spring Harbor Laboratory Press 等の記載に準じて行うことができる。

## 【0041】

プローブに用いる DNA は放射性同位元素により標識されたものや、蛍光色素で標識されたものであってもよい。

プローブに用いる DNA を放射性同位元素により標識する方法としては、例えば Random Primer Labeling Kit (宝酒造社製) 等を利用することにより、PCR 反応液中の dCTP を ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P) dCTP に替えて、プローブに用いる DNA を鋳型にして PCR を行う方法が挙げられる。

また、プローブに用いる DNA を蛍光色素で標識する場合には例えばアマシャム製の ECL Direct Nucleic Acid Labeling and Detection System 等を用いることができる。

## 【0042】

ハイブリダイゼーションは例えば以下の通りに行うことができる。

450～900 mM の塩化ナトリウム及び 45～90 mM のクエン酸ナトリウムを含みドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を 0.1～1.0 重量% の濃度で含み、変性した非特異的 DNA を 0～200  $\mu$ l/ml の濃度で含み、場合によってはアルブミン、フィコール、ポリビニルピロリドン等をそれぞれ 0～0.2 重量% の濃度で含んでもよいプレハイブリダイゼーション液 (好ましくは 90 mM の塩化ナトリウム、90 mM のクエン酸ナトリウム、1.0% の SDS 及び 100  $\mu$ l/ml の変性 Calf-thymus DNA を含むプレハイブリダイゼーション

液)を上記のようにして作製したメンブレン  $1 \text{ cm}^2$  当たり  $50 \sim 200 \mu\text{l}$  の割合で準備し、該プレハイブリダイゼーション液に前記メンブレンを浸して  $42 \sim 65^\circ\text{C}$  で  $1 \sim 4$  時間保温する。

次いで、例えば、 $450 \sim 900 \text{ mM}$  の塩化ナトリウム及び  $45 \sim 90 \text{ mM}$  のクエン酸ナトリウムを含み、SDS を  $0.1 \sim 1.0$  重量%の濃度で含み、変性した非特異的DNAを  $0 \sim 200 \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で含み、場合によってはアルブミン、フィコール、ポロビニルピロリドン等をそれぞれ  $0 \sim 0.2\%$  の濃度で含んでいてもよいハイブリダイゼーション溶液（好ましくは、 $900 \text{ mM}$  の塩化ナトリウム、 $90 \text{ mM}$  のクエン酸ナトリウム、 $1.0$  重量%のSDS及び  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  の変性Calf-thymusDNAを含むハイブリダイゼーション溶液）と前述の方法で調製して得られたプローブ（メンブレン  $1 \text{ cm}^2$  当たり  $1.0 \times 10^4 \sim 2.0 \times 10^6 \text{ cpm}$  相当量）とを混合した溶液をメンブレン  $1 \text{ cm}^2$  当たり  $50 \sim 200 \mu\text{l}$  の割合で準備し、該ハイブリダイゼーション溶液に浸し  $42 \sim 65^\circ\text{C}$  で  $12 \sim 20$  時間保温する。

#### 【0043】

該ハイブリダイゼーション後、メンブレンを取り出し、 $15 \sim 300 \text{ mM}$  の塩化ナトリウム  $1.5 \sim 30 \text{ mM}$  クエン酸ナトリウム及び  $0.1 \sim 1.0\%$  のSDS等を含む  $42 \sim 65^\circ\text{C}$  の洗浄液（好ましくは  $15 \text{ mM}$  の塩化ナトリウム、 $1.5 \text{ mM}$  のクエン酸ナトリウム及び  $1.0\%$  のSDSを含む  $65^\circ\text{C}$  の洗浄液）等を用いて洗浄する。洗浄したメンブレンは  $2 \times \text{SSC}$  ( $300 \text{ mM}$  塩化ナトリウム、 $30 \text{ mM}$  クエン酸ナトリウム)で軽くすすいだ後、乾燥する。このメンブレンを例えばオートラジオグラフィー等に従ってメンブレン上のプローブの位置を検出することにより用いたプローブとハイブリダイズするDNAのメンブレン上の位置に相当するクローンをもとの寒天培地上で特定しこれを釣菌することにより、当該DNAを有するクローンを単離することができる。

#### 【0044】

このようにして得られるクローンを培養し、培養菌体から本発明の遺伝子のDNAを調製することができる。

#### 【0045】

上記のようにして調製されたDNAを「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press、「Current Protocols in Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載されている方法に準じてベクターにクローニングして本発明組換ベクターを得ることができる。用いられるベクターとしては、具体的には、例えば、pUC119(宝酒造社製)、pTV118N(宝酒造社製)、pBluescriptII(東洋紡社製)、pCR2.1-TOPO(Invitrogen社製)、pTrc99A(Pharmacia社製)、pKK223-3(Pharmacia社製)などが挙げられる。

## 【 0 0 4 6 】

また、前述のDNAの塩基配列は、F.Sanger, S.Nicklen, A.R.Coulson著、Proceeding of Natural Academy of Science U.S.A.(1977) 74: 5463-5467頁等に記載されているダイデオキシターミネーター法等により解析することができる。塩基配列分析用の試料調製には、例えば、パーキンエルマー社のABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit等の市販の試薬を用いてもよい。

## 【 0 0 4 7 】

上述のようにして得られるDNAが、4-ブロモ-3-オキソ酪酸メチルを不斉還元して(S)-4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを優先して生産する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードしていることの確認は例えば以下のようにして行うことができる。

## 【 0 0 4 8 】

まず上述のようにして得られるDNAを後述のように、宿主細胞において機能可能なプロモーターの下流に接続されるようにベクターに挿入し、このベクターを宿主細胞に導入して形質転換体を取得する。次いで該形質転換体の培養物を4-ブロモ-3-オキソ酪酸メチルに作用させる。反応生成物中の(S)-4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルの量を分析することにより、得られたDNAがかかる能力を有するタンパク質をコードすることが確認できる。

## 【 0 0 4 9 】

本発明の遺伝子を宿主細胞で発現させるには、宿主細胞で機能可能なプロモ-



ターと本発明の遺伝子とが機能可能な形で接続されてなる遺伝子を宿主細胞に導入する。

#### 【0050】

ここで、「機能可能な形で」とは、該遺伝子を宿主細胞に導入し宿主細胞を形質転換させた際に、本発明の遺伝子が、プロモーターの制御下に発現するようにプロモーターと結合された状態にあることを意味する。プロモーターとしては大腸菌のラクトースオペロンのプロモーター、大腸菌のトリプトファンオペロンのプロモーター、または、tacプロモーターもしくはtrcプロモーター等の大腸菌内で機能可能な合成プロモーターなどをあげることができ、ペニシリウムシトリナムにおいて本発明遺伝子の発現を制御しているプロモーターを利用してもよい。

#### 【0051】

一般的には、宿主細胞で機能可能なプロモーターと機能可能な形で接続されてなる本発明遺伝子を前述のようなベクターに組み込んで、宿主細胞に導入する。ベクターとしては選択マーカー遺伝子（例えばカナマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等の抗生物質耐性付与遺伝子等）を含むベクターを用いると、該ベクターが導入された形質転換体を当該選択マーカー遺伝子の表現型等を指標にして選択することができる。

#### 【0052】

本発明遺伝子を導入する宿主細胞としては、例えば、Escherichia属、Bacillus属、Corynebacterium属、Staphylococcus属、Streptomyces属、Saccharomyces属、Kluyveromyces属及びAspergillus属に属する微生物などがあげられる。

#### 【0053】

遺伝子を宿主細胞へ導入する方法は、宿主となる細胞に応じて通常用いられる方法であればよく、例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 「Current Protocols in Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される塩化カルシウム法や、「Methods in Electroporation: Gene Pulser /E.coli Pulser System」 Bio-Rad Laboratories, (1993)等に記載されるエレクトロポレーション法などをあげることができる。

## 【0054】

本発明遺伝子が導入された形質転換体は、例えば前述のようなベクターに含まれる選択マーカー遺伝子の表現型を指標に選抜することができる。

該形質転換体が本発明遺伝子を保有していることは、該形質転換体からベクターDNAを調製した後、調製されたDNAについて例えば「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press等に記載される通常の方法に準じて、制限酵素部位の確認、塩基配列の解析、サザンハイブリダイゼーション、ウエスタンハイブリダイゼーション等を行うことにより、確認することができる。

## 【0055】

次に本発明タンパク質について説明する。

本発明タンパク質は、以下のアミノ酸配列を有することを特徴とする。

- a) 配列番号1で示されるアミノ酸配列。
- b) 配列番号2で示される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列がコードするアミノ酸配列であって、かつ、4-ブロモ-3-オキソ酪酸メチルを不斉還元して(S)-4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルを優先的に生産する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列。
- c) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、4-ブロモ-3-オキソ酪酸メチルを不斉還元して(S)-4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルを優先的に生産する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列。

## 【0056】

本発明タンパク質において配列番号1で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列としては、例えば配列番号1で示されるアミノ酸配列のC末端側にTrp-Ile-Ser-Thr-Lys-Leuの6アミノ酸が付加されたアミノ酸配列が挙げられる。

## 【0057】

本発明タンパク質は例えば本発明遺伝子を有する形質転換体を培養することに

より製造することができる。

該微生物を培養するための培地としては、微生物の培養に通常使用される炭素源や窒素源、有機塩や無機塩等を適宜含む各種の培地を用いることができる。

#### 【0058】

炭素源としては例えばグルコース、デキストリン、シュークロース等の糖類、グリセロール等の糖アルコール、フマル酸、クエン酸、ピルビン酸等の有機酸、動物油、植物油及び糖蜜が挙げられる。これらの炭素源の培地への添加量は培養液に対して通常0.1～30% (w/v) 程度である。

#### 【0059】

窒素源としては例えば肉エキス、ペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、大豆粉、コーン・スティーブ・リカー (Corn Steep Liquor)、綿実粉、乾燥酵母、カザミノ酸等の天然有機窒素源、アミノ酸類、硝酸ナトリウム等の無機酸のアンモニウム塩、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸のアンモニウム塩、フマル酸アンモニウム、クエン酸アンモニウム等の有機酸のアンモニウム塩及び尿素が挙げられる。これらのうち有機酸のアンモニウム塩、天然有機窒素源、アミノ酸類等は多くの場合炭素源としても使用することができる。これらの窒素源の培地への添加量は培養液に対して通常0.1～30% (w/v) 程度である。

#### 【0060】

有機塩や無機塩としては、例えばカリウム、ナトリウム、マグネシウム、鉄、マンガン、コバルト、亜鉛等の塩化物、硫酸塩、酢酸塩、炭酸塩及びリン酸塩を挙げることができる。具体的には例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、塩化コバルト、硫酸亜鉛、硫酸銅、酢酸ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸水素一カリウム及びリン酸水素二カリウムが挙げられる。これらの有機塩及び／又は無機塩の培地への添加量は培養液に対して通常0.0001～5% (w/v) 程度である。

#### 【0061】

さらに、tacプロモーター、trcプロモーター及びlacプロモーター等のアロラクトースで誘導されるタイプのプロモーターと本発明遺伝子とが機能可能な形で

接続されてなる遺伝子が導入された宿主細胞の場合には、本発明タンパク質の生産を誘導するための誘導剤として、例えばisopropyl thio- $\beta$ -D-galactoside (IPTG) を培地中に少量加えることもできる。

#### 【0062】

本発明遺伝子を有する微生物の培養は微生物の培養に通常使用される方法に準じて行うことができ、例えば試験管振盪式培養、往復式振盪培養、ジャーファーマンター (Jar Fermenter) 培養、タンク培養等の液体培養及び固体培養が挙げられる。

培養温度は、該微生物が生育可能な範囲で適宜変更できるが、通常約15～40℃である。培地のpHは約6～8の範囲が好ましい。培養時間は培養条件によって異なるが通常約1日～約5日が好ましい。

#### 【0063】

本発明遺伝子を有する微生物の培養物から本発明タンパク質を精製する方法としては、通常のタンパク質の精製において使用される方法を適用することができ、例えば次のような方法を挙げることができる。

#### 【0064】

まず、微生物の培養物から遠心分離等により菌体を集めた後、これを超音波処理、ダイノミル処理、フレンチプレス処理等の物理的破碎法又は界面活性剤若しくはリゾチーム等の溶菌酵素を用いる化学的破碎法等によって破碎する。得られた破碎液から遠心分離、メンブレンフィルター濾過等により不純物を除去して無細胞抽出液を調製し、これを陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー等の分離精製方法を適宜用いて分画することによって、本発明タンパク質を精製することができる。

クロマトグラフィーに使用する担体としては、例えば、カルボキシメチル (CM) 基、ジエチルアミノエチル (DEAE) 基、フェニル基若しくはブチル基を導入したセルロース、デキストリン又はアガロース等の樹脂担体が挙げられる。市販の担体充填済カラムを用いることもでき、かかる市販の担体充填済カラムとしては例えば、Q-Sepharose FF、Phenyl-Sepharose HP (商品名、いずれもアマ

シヤム ファルマシア バイオテック社製)、T S K - g e l G 3 0 0 0 S W (商品名、東ソー社製) 等が挙げられる。

なお、本発明タンパク質を含む画分は、例えば4-ブロモ-3-オキシ酪酸メチルを不斉還元して(S)-4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルを優先的に生産する能力を指標に選抜することができる。

#### 【0065】

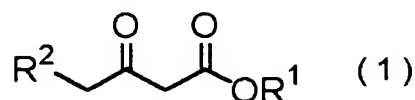
次に、本発明における(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法について説明する。

該製造法は4-ハロ-3-オキシ酪酸エステルに本発明タンパク質、それを産生する形質転換体又はその処理物を作用させることを特徴とする。

#### 【0066】

4-ハロ-3-オキシ酪酸エステルは下記一般式(1)で示される化合物である。

#### 【化1】



一般式(1)において、 $\text{R}^1$ は例えばC1-C8アルキル基を表し、 $\text{R}^2$ はハロゲン原子を表す。

4-ハロ-3-オキシ酪酸エステルとしては、具体的には例えば4-クロロ-3-オキシ酪酸メチル、4-クロロ-3-オキシ酪酸エチル、4-クロロ-3-オキシ酪酸プロピル、4-ブロモ-3-オキシ酪酸メチル、4-ブロモ-3-オキシ酪酸エチル、4-ブロモ-3-オキシ酪酸プロピル及び4-ブロモ-3-オキシ酪酸オクチルが挙げられる。

#### 【0067】

上記方法は通常水及び還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリ酸(以下、NADPHと記す。)の存在下に行われる。この際に用いられる水は、緩衝水溶液であってもよい。該緩衝水溶液に用いられる緩衝剤としては例えばリン酸ナトリウム、リン酸カリウム等のリン酸アルカリ金属塩、酢酸ナトリウム水溶液、酢酸カリウム等の酢酸アルカリ金属塩及びこれらの混合物が挙げられる。

## 【0068】

上記方法においては水に加えて有機溶媒を共存させることもできる。共存させることができる有機溶媒としては例えば $\alpha$ -ブチルメチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、テトラヒドロフラン等のエーテル類、ギ酸エチル、酢酸エチル、酢酸プロピル、酢酸ブチル、プロピオン酸エチル、プロピオン酸ブチル等のエステル類、トルエン、ヘキサン、シクロヘヘキサン、ヘプタン、イソオクタン等の炭化水素類、メタノール、エタノール、2-プロパノール、ブタノール、 $\alpha$ -ブチルアルコール等のアルコール類ジメチルスルホキシド等の有機硫黄化合物、アセトン等のケトン類、アセトニトリル等のニトリル類及びこれらの混合物が挙げられる。

## 【0069】

上記方法は例えば水、NADPH、及び4-ハロ-3-オキシ酪酸エステルを、本発明タンパク質あるいはそれを産生する形質転換体又はその処理物とともに、必要によりさらに有機溶媒等を含有した状態で、攪拌、振盪等により混合することにより行われる。

## 【0070】

上記方法における反応時のpHは適宜選択することができるが、通常pH3～10の範囲である。反応温度は原料及び生成物の安定性、反応速度の点から通常0～60℃の範囲である。

## 【0071】

反応の終点は例えば反応液中の4-ハロ-3-オキシ酪酸エステルを液体クロマトグラフィー等により追跡することにより決めることができる。

反応時間は通常0.5時間から10日間の範囲である。

## 【0072】

反応液からの(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの回収は、一般に知られている任意の方法で行うことができる。

例えば反応液を有機溶媒抽出、濃縮等の後処理を行い必要によりカラムクロマトグラフィー、蒸留等により精製する方法が挙げられる。

## 【0073】

本発明タンパク質、それを産生する形質転換体又はその処理物は種々の形態で上記方法に用いることができる。

## 【 0 0 7 4 】

具体的な形態としては、例えば本発明遺伝子を有する形質転換体の培養物、本発明遺伝子を有する微生物の菌体、かかる菌体の処理物、無細胞抽出液、粗精製タンパク質、精製タンパク質等及びこれらの固定化物が挙げられる。ここで、菌体の処理物としては、例えば凍結乾燥菌体、有機溶媒処理菌体、乾燥菌体、菌体摩砕物、菌体の自己消化物、菌体の超音波処理物、菌体抽出物、菌体のアルカリ処理物が挙げられる。また、固定化物を得る方法としては例えば担体結合法（シリカゲルやセラミック等の無機担体、セルロース、イオン交換樹脂等に本発明タンパク質等を吸着させる方法）及び包括法（ポリアクリルアミド、含硫多糖ゲル（例えばカラギーナンゲル）、アルギン酸ゲル、寒天ゲル等の高分子の網目構造の中に本発明タンパク質等を閉じ込める方法）が挙げられる。

## 【 0 0 7 5 】

特に本発明遺伝子を有する形質転換体を用いる場合における工業的な生産を考慮すれば、生菌体を用いるよりも該菌体を死滅化させた処理物として用いる方法が製造設備の制限が少ないという点では好ましい。そのための死菌化処理方法としては例えば、物理的殺菌法（加熱、乾燥、冷凍、光線、超音波、濾過、通電）や、化学薬品を用いる殺菌法（アルカリ、酸、ハロゲン、酸化剤、硫黄、ホウ素、砒素、金属、アルコール、フェノール、アミン、サルファイド、エーテル、アルデヒド、ケトン、シアン及び抗生物質）が挙げられる。一般的には、これらの殺菌法のうちできるだけ本発明タンパク質の酵素活性を失活させず、かつ反応系への残留、汚染などの影響が少ない処理法を選択するのが望ましい。

## 【 0 0 7 6 】

また、本発明の（S）-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法はNADPHの存在下に行われ、このNADPHは酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリジン酸（以下、 $\text{NADP}^+$ と記す）に変換される。 $\text{NADP}^+$ は $\text{NADP}^+$ をNADPHに変換する能力を有する酵素によりもとのNADPHに戻すことができるので、上記方法の反応系には $\text{NADP}^+$ をNADPHに変換する

能力を有する酵素、該酵素をもつ微生物又は該酵素をもつ微生物の処理物を加えることもできる。

$\text{NADP}^+$ を $\text{NADPH}$ に変換する能力を有する酵素としては例えばグルコース脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、アルデヒド脱水素酵素、アミノ酸脱水素酵素及び有機脱水素酵素（リンゴ酸脱水素酵素等）が挙げられる。

また、 $\text{NADP}^+$ を $\text{NADPH}$ に変換する酵素がグルコース脱水素酵素である場合にはグルコース等を添加することにより該酵素の活性が増強される場合もあり、反応液にこれらを加えてもよい。

また、 $\text{NADP}^+$ を $\text{NADPH}$ に変換する能力を有する酵素をもつ微生物は $\text{NADP}^+$ を $\text{NADPH}$ に変換する能力を有する酵素をコードする遺伝子をもつ形質転換体であってもよい。

#### 【0077】

さらに、本発明の（S）-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法は $\text{NADP}^+$ を $\text{NADPH}$ に変換する能力を有する酵素であるグルコース脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、アルデヒド脱水素酵素、アミノ酸脱水素酵素及び有機脱水素酵素（リンゴ酸脱水素酵素等）等をコードする遺伝子と本発明遺伝子とを同時に宿主に導入した形質転換体を用いて行うこともできる。

この形質転換体において、2つの遺伝子を宿主へ導入する方法としては例えば単一のベクター中に複数の遺伝子を導入する方法、複製起源のことなる複数のベクターに別々に遺伝子を導入した組換えベクターにより宿主を形質転換する方法及び一方若しくは両方の遺伝子を染色体中に導入する方法が挙げられる。

また、単一のベクター中に複数の遺伝子を導入する方法としては、具体的には例えばプロモーター、ターミネーター等発現制御に関わる領域をそれぞれの遺伝子に連結する方法及びラクトースオペロンのような複数のシストロンを含むオペロンとして発現させる方法が挙げられる。

#### 【0078】

#### 【実施例】

以下、実施例等により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はそれらの実施例によって何ら限定されるものではない。



## 参考例

500 ml フラスコに培地（水にポテト・デキストロース・ブロー（バクトン・ディッキンソン社製）を24 g/Lの割合で溶解したもの）100 mlを入れ、121℃で15分間滅菌した。ここに同組成の培地中で培養（30℃、48時間、振盪培養）したペニシリウム・シトリナム（*Penicillium citrinum*）IF04631株の培養液0.5 mlを加え、30℃で72時間振盪培養した。その後、得られた培養液を遠心し（8000 x g、10分）、生じた沈殿を集めた。この沈殿を20 mMリン酸カリウムバッファー（pH 7.0）50 mlで3回洗浄して、約1.0 gの湿菌体を得た。

上記湿菌体約1.0 gを用いて、チオシアン酸グアニジンフェノールクロロホルム法で全RNAを調製し、約1.5 mgの全RNAを得た。さらに0.5 mgの全RNAからOligotex(dT)30-Super（宝酒造社製）を用いてpoly(A)を有するRNA約9.3 μgを得た。

## 【0079】

cDNAライブラリーの作製はGubler and Hoffman法に基づいて以下のとおり実施した。上記のpoly(A)を有するRNA（3.0 μg）とOligo(dT)18-リンカープライマー（（含XhoIサイト）宝酒造社製）、RAV-2 Rtase及びSuperScript I Rtaseを用いて一本鎖cDNAを調製し、この反応液にE. coli DNA polymerase、E. coli Rnase/E. coli DNA Ligase Mixture及びT4 DNA Polymeraseを加え、二本鎖cDNAの合成と平滑末端化を行った。次いで、この二本鎖cDNAとEcoRI-NotI-BamHIアダプター（宝酒造社製）とのライゲーションを行った。ライゲーション後のDNAをリン酸化処理、XhoIで切断、スピンカラム（宝酒造社製）で低分子量DNAを除去、λ ZapII（EcoRI-XhoI切断）とライゲーションを行った後、in vitro packaging kit（STRATAGENE社製）を用いて、パッケージングし、cDNAライブラリー（以下、cDNAライブラリー（A）と記す。）を得た。

## 【0080】

## 実施例1

## (1)

参考例と同様の条件で調製したペニシリウム・シトリナム（*Penicillium citrinum*）

um) IF04631株の湿菌体約23 gを、50 mMリン酸カリウムバッファー (pH 7.0) 160 mlに懸濁しダイノミル (シンマルエンタープライズ製、ガラスビーズ0.1~0.2 mm $\phi$ 、3000 rpm、30分)で破碎した。得られた破碎液を遠心分離 (10000 x g、10分間)し、上清をさらに超遠心分離 (100000 x g、120分間)して、超遠心上清160 mlを得た。

得られた超遠心上清160 mlに硫酸アンモニウムをその濃度が1.5 Mになるまで徐々に加えた。これを疎水性相互作用クロマトグラフィーカラム [Hi-Load Phenyl (26/10) (アマシャムファルマシアバイオテク社製)] [1.5 M硫酸アンモニウムを含むBIS-TRIS-PROPANEバッファー (20 mM、pH 7.0)で平衡化したもの]に展着し、硫酸アンモニウムを溶解したBIS-TRIS-PROPANEバッファー (硫酸アンモニウム濃度1.5 M $\rightarrow$ 0.6 Mの濃度勾配)を移動層として溶出し、還元酵素活性を有する画分として硫酸アンモニウム濃度が1.1~0.9 Mの溶出画分20 mlを得た。

#### 【0081】

この溶出画分を脱塩し、Tris-HCl緩衝液 (20 mM、pH 7.7)に置換した。これをイオン交換クロマトグラフィーカラム [Hi-Load Q Sepharose (16/10) (アマシャムファルマシアバイオテク社製)] [Tris-HCl緩衝液 (20 mM、pH 7.7)で平衡化したもの]に展着し、塩化ナトリウムを溶解したTris-HCl緩衝液 (塩化ナトリウム濃度0 $\rightarrow$ 0.5 Mの濃度勾配)を移動層として溶出し、還元酵素活性を有する画分として塩化ナトリウム濃度0.2~0.8 Mの画分3 mlを得た。これを濃縮し、濃宿液をゲル濾過 [カラム: スーパーデックス200 (10/30) (アマシャムファルマシアバイオテク社製)] [移動層: BIS-TRIS-PROPANEバッファー (20 mM、pH 7.0)]し、還元酵素活性を有する画分として分子量約33000ダルトンの部分1 ml (以下、活性画分(A)と記す。)を得た。

#### 【0082】

なお、クロマトグラフィー等で得られた画分は以下の操作により還元酵素活性を測定した。

4-ブロモ-3-オキソ酪酸メチル (1.56 mg/ml) 及びNADPH (

0.226 mg/ml) を溶解したリン酸緩衝液 (20 mM, pH 7.0) 0.9 ml にクロマトグラフィー等により得られた溶出画分を加えて全量を 1 ml とし、37℃で20秒間保温した後、340 nm の吸光度を測定した。340 nm の吸光度から NADPH の消費量を計算して画分の還元酵素活性を求めた。

## 【0083】

(2)

上記操作により得られた活性画分 (A) を Laemmli, U. K., Nature, (1970) 227, 680 記載の方法に準じて SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動した。電気泳動後のゲルをクマシーブリリアントブルー G250 染色液 (BIO-RAD 社製) で染色し、染色された部分のゲルを切り取った。このゲルをジチオスレイトール及びヨウ化アセトアミドを用いて還元アルキル化し、トリプシンを処理した後、ゲルからペプチドを抽出した。抽出したペプチドを HPLC (カラム: TSK gel ODS-80=Ts, 2.0mm×250mm (東ソー株式会社)、移動層: 0.1% トリフルオロ酢酸水/アセトニトリル = 100/0 → 20/80 の濃度勾配) により分取した。分取した各画分の TOF-MS スペクトルから純度が高いことが判明した5個の画分につきアミノ酸配列をプロテインシーケンサー (494 cLC) により決定した。決定したアミノ酸配列のそれぞれを配列番号 3、4、5、6、7 に示す。

## 【0084】

(3)

配列番号 3 で示されるアミノ酸配列を基に、配列番号 8、9、10、11、12、13、14 で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを合成した。

## 【0085】

配列番号 8、9、10、11、12、13、14 で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーのいずれかと SK オリゴヌクレオチドプライマー (STRATAGENE 社製) とをプライマーに、前記 cDNA ライブラリー (A) を鋳型にして、下記反応液組成、反応条件で PCR を行った。(ロシュ・ダイアグノスティック社製の Expand High Fidelity PCR System を使用した。)

## 【 0 0 8 6 】

## [反応液組成]

cDNAライブラリー原液	1 $\mu$ l
dNTP(各2.5mM-mix)	0.4 $\mu$ l
プライマー(20pmol/ $\mu$ l)	各0.75 $\mu$ l
10xbuffer(with MgCl)	5 $\mu$ l
enz.expandHiFi ( $3.5 \times 10^3$ U/ml)	0.375 $\mu$ l
超純水	41.725 $\mu$ l

## [反応条件]

上記組成の反応液が入った容器をPERKIN ELMER-GeneAmp PCR System2400にセットし、97℃(2分間)に加熱した後、97℃(0.25分間) - 50℃(0.5分間) - 72℃(1.5分間)のサイクルを10回、次いで97℃(0.25分間) - 55℃(0.5分間) - 72℃(2.5分間)のサイクルを20回行い、さらに72℃で7分間保持した。

## 【 0 0 8 7 】

その後、PCR反応液の一部をとり、アガロースゲル電気泳動を行ったところ、プライマーとして、配列番号10で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとSKオリゴヌクレオチドプライマーとを用いた場合、配列番号12で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとSKオリゴヌクレオチドプライマーとを用いた場合及び配列番号14で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとSKオリゴヌクレオチドプライマーとを用いた場合において各々約740bpのDNA断片のバンドが検出された。

## 【 0 0 8 8 】

約740bpのDNA断片のバンドが検出されたPCR反応液のそれぞれをそのまま用いて、上記の約740bpのDNA断片のそれぞれを、pCR2.1-TOPOベクターの既存「PCR Product挿入サイト」にライゲーションし(Invitrogen社製TOPO<sup>TM</sup>TA cloningキット使用)、得られたライゲーション液でE. coli DH5 $\alpha$ を形質転換した。

50  $\mu$  g/mlのアンピシリンを含有するLB(1%バクトートリプトン、0.5%バクトー酵母エキス、1%塩化ナトリウム)寒天培地に5-ブロモ-4-ク

ロロー 3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトシド（以下、X-gal と記す）4% 水溶液 30  $\mu$ l 及び 0.1 M IPTG 30  $\mu$ l を塗布し、そこに得られた形質転換体を接種し培養した。形成したコロニーのうち白いコロニーを 1 個ずつとり、このコロニーを 50  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含有する滅菌 LB 培地（2 ml）に接種し、試験管中で振盪培養した（30℃、24 時間）。それぞれの培養菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit（Qiagen 社製）を用いてプラスミドを取り出した。

以下、配列番号 10 で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと SK オリゴヌクレオチドプライマーとをプライマーに用いて PCR した場合に得られた DNA 断片に由来するプラスミドをプラスミド p 27-1、配列番号 12 で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと SK オリゴヌクレオチドプライマーとをプライマーに用いて PCR した場合に得られた DNA 断片に由来するプラスミドをプラスミド p 27-2 及び配列番号 14 で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと SK オリゴヌクレオチドプライマーとをプライマーに用いて PCR した場合に得られた DNA 断片に由来するプラスミドをプラスミド p 27-3 と記す。

#### 【0089】

プラスミド p 27-1、プラスミド p 27-2 及びプラスミド p 27-3 のそれぞれに挿入された DNA 断片の塩基配列を解析したところ、挿入された DNA 断片の塩基配列はプライマーの塩基は配列部分を除き全て同一であった。

プラスミド p 27-1 に挿入された DNA 断片の塩基配列を配列番号 15 に示す。

なお、プラスミドに挿入された DNA 断片の塩基配列の解析は、Dye Terminator Cycle sequencing FS ready Reaction Kit（パーキンエルマー製）を用いて各プラスミドを鋳型としてシーケンス反応を行い、得られた DNA の塩基配列を DNA シーケンサー 373A（パーキンエルマー製）で解析することにより行った。

#### 【0090】

（4）

配列番号 15 で示される塩基配列を基に配列番号 16 及び配列番号 17 で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを合成した。

## 【 0 0 9 1 】

配列番号 16 で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと S K オリゴヌクレオチドプライマー (STRATAGENE 社製) とを、又は配列番号 17 で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと T 7 オリゴヌクレオチドプライマー (STRATAGENE 社製) とをプライマーに、前記 c D N A ライブラリー (A) を鋳型にして下記反応液組成、反応条件で P C R を行った。(ロシュ・ダイアグノスティック社製の Expand High Fidelity PCR System を使用)

## 【 0 0 9 2 】

## [反応液組成]

cDNA ライブラリー原液	1 $\mu$ l
dNTP (各 2.5mM-mix)	0.4 $\mu$ l
プライマー (20pmol/ $\mu$ l)	各 0.75 $\mu$ l
10xbuffer (with MgCl)	5 $\mu$ l
enz.expandHiFi ( $3.5 \times 10^3$ U/ml)	0.375 $\mu$ l
超純水	41.725 $\mu$ l

## 【 0 0 9 3 】

## [反応条件]

上記組成の反応液が入った容器を PERKIN ELMER-GeneAmp PCR System2400 にセットし、97℃ (2分間) に加熱した後、97℃ (0.25分間) - 55℃ (0.5分間) - 72℃ (1.5分間) のサイクルを 10 回、次いで 97℃ (0.25分間) - 55℃ (0.5分間) - 72℃ (2.5分間) のサイクルを 20 回行い、さらに 72℃ で 7 分間保持した。

## 【 0 0 9 4 】

その後、P C R 反応液の一部をとり、アガロースゲル電気泳動を行った結果、プライマーとして、配列番号 16 で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと S K オリゴヌクレオチドプライマーとを用いた場合には約 350 b p の D N A 断片のバンドが検出され、配列番号 17 で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと T 7 オリゴヌクレオチドプライマーとを用い

た場合には約 650 bp の DNA 断片のバンドが検出された。

【0095】

上記の PCR で得られた約 350 bp の DNA 断片を含有する PCR 反応液又は約 650 bp の DNA 断片を含有する PCR 反応液をそのまま用いて、上記の約 350 bp の DNA 断片と約 650 bp の DNA 断片のそれぞれを pCR2.1-TOP0ベクターの既存「PCR Product挿入サイト」にライゲーションし（Invitrogen社製TOP0<sup>TM</sup>TA cloningキット使用）、それぞれのライゲーション液でE. coli DH5 $\alpha$ を形質転換した。

50  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含有するLB寒天培地にX-gal 4%水溶液30  $\mu$ l及び0.1M IPTG 30  $\mu$ lを塗布し、そこに得られた形質転換体を接種し培養した。形成したコロニーのうち白いコロニーを1個ずつとり、このコロニーを50  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含有する滅菌LB培地（2ml）に接種し、試験管中で振盪培養した（30℃、24時間）。それぞれの培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit（Qiagen社製）を用いてプラスミドを取り出した。

以下、配列番号16で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとSKオリゴヌクレオチドプライマーとをプライマーに用いてPCRすることにより得られたDNA断片に由来するプラスミドをプラスミドpBR-1、配列番号17で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとT7オリゴヌクレオチドプライマーとをプライマーに用いてPCRすることにより得られたDNA断片に由来するプラスミドをプラスミドpBR-2と記す。

【0096】

次に、プラスミドpBR-1及びプラスミドpBR-2のそれぞれに挿入されたDNA断片の塩基配列を解析した。プラスミドpBR-1に挿入されたDNA断片の塩基配列を配列番号18に、プラスミドpBR-2に挿入されたDNA断片の塩基配列を配列番号19に示す。

なお、プラスミドに挿入されたDNA断片の塩基配列の解析は、Dye Terminator Cycle sequencing FS ready Reaction Kit（パーキンエルマー製）を用いて各プラスミドを鋳型としてシーケンス反応を行い、得られたDNAの塩基配列をDNAシーケンサー373A（パーキンエルマー製）で解析することにより行った

## 【 0 0 9 7 】

(5)

配列番号 1 5 で示される塩基配列を基に配列番号 2 0 で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、また、配列番号 1 9 で示される塩基配列を基に配列番号 2 1 で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを合成した。

## 【 0 0 9 8 】

配列番号 2 0 で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号 2 1 で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとをプライマーに、前記 cDNA ライブラリー (A) を鋳型にして下記反応液組成、反応条件で PCR を行った。(ロシュ・ダイアグノスティック社製の Expand High Fidelity PCR System を使用)

## 【 0 0 9 9 】

## [ 反応液組成 ]

cDNA ライブラリー原液	1 $\mu$ l
dNTP (各 2.5mM-mix)	0.4 $\mu$ l
プライマー (20pmol/ $\mu$ l)	各 0.75 $\mu$ l
10xbuffer (with MgCl)	5 $\mu$ l
enz. expandHiFi ( $3.5 \times 10^3$ U/ml)	0.375 $\mu$ l
超純水	41.725 $\mu$ l

## 【 0 1 0 0 】

## [ 反応条件 ]

上記組成の反応液が入った容器を PERKIN ELMER-GeneAmp PCR System2400 にセットし、97℃ (2分間) に加熱した後、97℃ (0.25分間) - 55℃ (0.5分間) - 72℃ (1.5分間) のサイクルを 1 0 回、次いで 97℃ (0.25分間) - 55℃ (0.5分間) - 72℃ (2.5分間) のサイクルを 2 0 回行い、さらに 72℃ で 7 分間保持した。

## 【 0 1 0 1 】

その後、PCR 反応液の一部をとり、アガロースゲル電気泳動を行った結果、



約400bpのDNA断片のバンドが検出された。

#### 【0102】

上記のPCRで得られた約400bpのDNA断片を含有するPCR反応液をそのまま用いて、上記の約400bpのDNA断片をpCR2.1-TOP0ベクターの既存「PCR Product挿入サイト」にライゲーションし（Invitrogen社製TOPO<sup>TM</sup>TA cloningキット使用）、該ライゲーション液でE. coli DH5 $\alpha$ を形質転換した。

50 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含有するLB寒天培地にX-gal 4%水溶液30 $\mu$ l及び0.1M IPTG30 $\mu$ lを塗布し、そこに得られた形質転換体を接種し培養した。形成したコロニーのうち白いコロニーを1個とり、このコロニーを50 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含有する滅菌LB培地（2ml）に接種し、試験管中で振盪培養した（30℃、24時間）。この培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit（Qiagen社製）を用いてプラスミドを取り出した（以下、このプラスミドをプラスミドpBR-3と記す）。

#### 【0103】

次に、プラスミドpBR-3に挿入されたDNA断片の塩基配列を解析した。プラスミドpBR-3に挿入されたDNA断片の塩基配列を配列番号22に示す。

なお、プラスミドに挿入されたDNA断片の塩基配列の解析は、Dye Terminator Cycle sequencing FS ready Reaction Kit（パーキンエルマー製）を用いてプラスミドpBR-3を鋳型としてシーケンス反応を行い、得られたDNAの塩基配列をDNAシーケンサー373A（パーキンエルマー製）で解析することにより行った。

#### 【0104】

配列番号18、19、22で示される塩基配列を基にORF検索を行い、ペニシリウム・シトリナムIFO4631株が有する4-ブロモ-3-オキソ酪酸メチルを不斉還元して（S）-4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルを優先的に生産する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列（配列番号28）を決定した。さらに配列番号28をもとに該タンパク質のアミノ酸配列（配列番号1）を決定した。なお、配列番号1と配列番号3、4、5、6、7とを比較

したところ、配列番号 3、4、5、6、7 で示されるアミノ酸配列は配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の一部分とほぼ一致することがわかった。

## 【0105】

## 実施例 2

## (1)

配列番号 18 に示される塩基配列を基に配列番号 23 で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを、配列番号 19 で示される塩基配列を基に配列番号 24 で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを合成した。

## 【0106】

配列番号 23 で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号 24 で示されるオリゴヌクレオチドプライマーとをプライマーに、前記 cDNA ライブラリー (A) を鋳型にして下記反応液組成、反応条件で PCR を行った。(ロシュ・ダイアグノスティック社製の Expand High Fidelity PCR System を使用)

## 【0107】

## [反応液組成]

cDNA ライブラリー原液	1 $\mu$ l
dNTP (各 2.5mM-mix)	0.4 $\mu$ l
プライマー (20pmol/ $\mu$ l)	各 0.75 $\mu$ l
10xbuffer (with MgCl)	5 $\mu$ l
enz.expandHiFi ( $3.5 \times 10^3$ U/ml)	0.375 $\mu$ l
超純水	41.725 $\mu$ l

## 【0108】

## [反応条件]

上記組成の反応液が入った容器を PERKIN ELMER-GeneAmp PCR System2400 にセットし、97℃ (2分間) に加熱した後、97℃ (0.25分間) - 55℃ (0.5分間) - 72℃ (1.5分間) のサイクルを 10 回、次いで 97℃ (0.25分間) - 55℃ (0.5分間) - 72℃ (2.5分間) のサイクルを 20 回行い、さらに 72℃ で 7 分間保持した。

## 【0109】

その後、PCR反応液を一部とりアガロースゲル電気泳動を行ったところ、約1000bpのDNA断片のバンドが検出された。

残りのPCR反応液に2種類の制限酵素(NcoI及びBamHI)を加え、約1000bpのDNA断片を2重消化させ、次いで酵素消化されたDNA断片を精製した。

一方、プラスミドベクターpTV118N(宝酒造社製)を2種類の制限酵素(NcoI及びBamHI)により2重消化させ、酵素消化されたDNA断片を精製した。

## 【0110】

これらの酵素消化させたDNA断片を混合し、T4 DNAリガーゼでライゲーションし、得られたライゲーション液でE. coli DH5 $\alpha$ を形質転換した。

得られた形質転換体を50  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含有するLB寒天培地で培養し、生育してきたコロニーの中から6コロニーを無作為に選抜した。この選抜したコロニーをそれぞれ50  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含有する滅菌LB培地(2ml)に接種し、試験管中で振盪培養した(30℃、24時間)。それぞれの培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit(Qiagen社製)を用いてプラスミドを取り出した。取り出したプラスミドのそれぞれの一部をNcoIとBamHIとの2種類の制限酵素により2重消化した後、電気泳動して、取り出したプラスミドは全て前記約1000bpのDNA断片が挿入されていることを確認した。(以下、このプラスミドをプラスミドpTRPcと記す。)

## 【0111】

(2)

プラスミドpTRPcを用いてE. coli HB101を形質転換した。得られた形質転換体を0.1mMのIPTG及び50  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含有する滅菌LB培地(100ml)に接種し、振盪培養した(30℃、12時間)。得られた培養液を遠心分離し、湿菌体0.4gを得た。

4-ブロモ-3-オキソ酪酸メチル300mg、前記湿菌体0.4g、NADP<sup>+</sup>9mg、グルコース750mg、グルコース脱水素酵素(天野製薬製)1.2

mg、100 mMリン酸緩衝液 (pH 6.5) 15 ml 及び酢酸ブチル 15 ml を混合し、30℃で7時間攪拌した。なお、攪拌中は反応液の pH が 6.5 ± 0.2 となるように 2 M 炭酸ナトリウム水溶液を徐々に加えた。その後、反応液を遠心分離し、有機層を得た。この有機層を下記条件でガスクロマトグラフィーによる含量分析を行ったところ、反応に用いた 4-ブロモ-3-オキシ酪酸メチルの量に対して 4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルは 98.5% 生成していることがわかった。また、下記条件で有機層中の 4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルの光学純度を測定したところ (S) 体が 99% e. e. 以上であった。さらに該有機層を濃縮することにより、粗 (S) - 4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルを得る。

## 【0112】

(含量分析条件)

カラム: HR-20M (0.53 mm × 30 m, 1 μm) (信和化工社製)

カラム温度: 120℃ (5分) → 3℃/分 → 150℃ (5分) → 10℃/分 → 200℃ (5分)

キャリアーガス: ヘリウム (流量: 20 ml/分)

検出器: FID

## 【0113】

(光学純度測定条件)

カラム: CHIRALCEL OD-H (0.46 cm × 25 m, 10 μm) (ダイセル化学工業社製)

移動層: n-ヘキサン: イソプロパノール = 9 : 1

流速: 0.5 ml/分

温度: 40℃

検出器: UV (220 nm)

なお、生成物の絶対立体配置は (S) - 4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルの標品と比較することにより決定した。

## 【0114】

実施例 3

(1)

プラスミド p T R P c を 2 種類 の 制限 酵素 (NcoI 及び BamHI) に より 2 重 消化 させ、 酵素 消化 された D N A 断 片 を 精 製 した。

一方、プラスミドベクター p T r c 9 9 A (Pharmacia製) を 2 種類 の 制限 酵素 (NcoI 及び BamHI) に より 2 重 消化 させ、 酵素 消化 された D N A 断 片 を 精 製 した。

これらの酵素消化させた D N A 断 片 を 混合 し、 T 4 D N A リ ガーゼ で ライゲーション し、 得 ら れ た ライゲーション 液 で E. coli DH5 $\alpha$  を 形 質 転 換 した。

得 ら れ た 形 質 転 換 体 を 5 0  $\mu$  g / m l の アンピシリン を 含有 する L B 寒 天 培 地 で 培養 し、 生育 して きた コロニー の 中 から 6 コロニー を 無 作為 に 選 抜 した。 この 選 抜 した コロニー を それ ぞれ 5 0  $\mu$  g / m l の アンピシリン を 含有 する 滅 菌 L B 培 地 (2 m l) に 接種 し、 試験 管 中 で 振 盪 培養 した (3 0  $^{\circ}$ C、 2 4 時間)。

それぞれの培養菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen 社 製) を 用 い て プラスミド を 取り 出 した。 取り 出 した プラスミド の それ ぞれ の 一 部 を 2 種類 の 制限 酵素 (NcoI 及び BamHI) に より 2 重 消化 した 後、 電気泳動 する こと に より、 取り 出 した プラスミド は 全 て 目的 と する D N A 断 片 が 挿 入 され ている こと を 確認 した。(以下、このプラスミドをプラスミド p T r c R P c と 記 す。)

【 0 1 1 5 】

(2)

プラスミド p T r c R P c を 用 い て E. coli HB101 を 形 質 転 換 した。

得 ら れ た 形 質 転 換 体 を 0. 1 m M の I P T G 及 び 5 0  $\mu$  g / m l の アンピシリン を 含有 する 滅 菌 L B 培 地 (1 0 0 m l) に 接種 し、 振 盪 培養 した (3 0  $^{\circ}$ C、 1 2 時間)。 得 ら れ た 培養 液 を 遠 心 分離 し、 湿 菌 体 0. 4 g を 得 た。

4 - ブロモ - 3 - オキソ酪酸メチル 1 5 0 0 m g、 前 記 湿 菌 体 0. 4 g、 N A D P<sup>+</sup> 1 8 m g、 グルコース 3 0 0 0 m g、 グルコース 脱 水 素 酵素 (天 野 製 薬 製) 3 m g、 1 0 0 m M リン酸緩衝液 (p H 6. 5) 1 5 m l 及 び 酢 酸 ブチル 1 5 m l を 混合 し、 3 0  $^{\circ}$ C で 7 時間 攪 拌 した。 な お、 攪 拌 中 は 反 応 液 の p H が 6. 5  $\pm$  0. 2 と なる よう に 2 M 炭 酸 ナ ト リ ウ ム 水 溶 液 を 徐 々 に 加 え た。 そ の 後、 反 応 液 を 遠 心 分離 し、 有 機 層 を 得 た。 この 有 機 層 を 実 施 例 2 の 含 量 分 析 条件 に より 含

量分析を行ったところ、反応に用いた4-ブロモ-3-オキシ酪酸メチルの量に対して4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルは99.2%生成していることがわかった。また、実施例2の光学純度測定条件で有機層中の4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルの光学純度を測定したところ(S)体が99%e.e.以上であった。

さらに該有機層を濃縮することにより、粗(S)-4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルを得る。

【0116】

#### 実施例4

(1)

*Bacillus megaterium* IF012108株を滅菌したLB培地100ml中で培養し、菌体0.4gを得た。この菌体からQiagen Genomic Tip (Qiagen社製)を用い、それに付属のマニュアルに記載の方法にしたがって染色体DNA(以下、染色体DNA(B)と記す。)を精製した。

(2)

The Journal of Biological Chemistry Vol.264, No.11, 6381-6385(1989)に記載された*Bacillus megaterium* IWG3由来のグルコース脱水素酵素の配列をもとに配列番号25で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号26で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとを合成した。

配列番号25で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号26で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーとをプライマーに用い、前記染色体DNA(B)を鋳型にして以下の反応液組成、反応条件でPCRを行った。(ロシュ・ダイアグノスティック社製のExpand High Fidelity PCR Systemを使用)

【0117】

[反応液組成]

染色体DNA原液	1 $\mu$ l
dNTP(各2.5mM-mix)	0.4 $\mu$ l

プライマー (20pmol/ $\mu$ l)	各0.75 $\mu$ l
10xbuffer(with MgCl)	5 $\mu$ l
enz.expandHiFi ( $3.5 \times 10^3$ U/ml)	0.375 $\mu$ l
超純水	41.725 $\mu$ l

## 【0118】

## [PCR反応条件]

上記組成に反応液が入った容器をPERKIN ELMER-GeneAmp PCR System2400にセットし、97℃ (2分間) に加熱した後、97℃ (0.25分間) - 55℃ (0.5分間) - 72℃ (1.5分間) のサイクルを10回、次いで97℃ (0.25分間) - 55℃ (0.5分間) - 72℃ (2.5分間) のサイクルを20回、さらに72℃で7分間保持した。

## 【0119】

その後、PCR反応液の一部をとり、アガロースゲル電気泳動を行った結果、約850bpのDNA断片のバンドが検出された。

得られたPCR反応液とInvitrogen社製TOPO<sup>TM</sup>TA cloningキットVer.Eとを用いて、PCRによって得られた約850bpのDNA断片をpCR2.1-TOPOベクターの既存「PCR Product挿入サイト」にライゲーションし、そのライゲーション液でE. coli DH5 $\alpha$ を形質転換した。

50  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含有するLB寒天培地にX-gal 4%水溶液30  $\mu$ l及び0.1M IPTG 30  $\mu$ lを塗布し、そこに得られた形質転換体を接種し培養した。形成したコロニーのうち白いコロニーを1個とり、このコロニーを50  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含有する滅菌LB培地(2ml)に接種し、試験管中で振盪培養した(30℃、24時間)。次いで培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いてプラスミドを取り出した。取り出したプラスミドの一部を2種類の制限酵素(NcoI及びBamHI)で二重消化し、電気泳動することにより、該プラスミドは約850bpのDNA断片が挿入されていることを確認した。(以下、このプラスミドをプラスミドpSDGDH12と記す。)

## 【0120】

次に、プラスミドpSDGDH12に挿入されたDNA断片の塩基配列を解析

した。その結果を配列番号 2 7 に示す。

なお、プラスミドに挿入された DNA 断片の塩基配列の解析は、Dye Terminator Cycle sequencing FS ready Reaction Kit (パーキンエルマー製) を用いてプラスミド p S D G D H 1 2 を鋳型としてシーケンス反応を行い、得られた DNA の塩基配列を DNA シーケンサー 373A (パーキンエルマー製) で解析することにより行った。

#### 【 0 1 2 1 】

##### ( 3 )

プラスミド p S D G D H 1 2 を 2 種類の制限酵素 (BamHI と XbaI) で二重消化させ、酵素消化された DNA 断片を精製した。

一方、プラスミド p T r c R P c を 2 種類の制限酵素 (BamHI と XbaI) で二重消化させ、酵素消化された DNA 断片を精製した。

それぞれの酵素消化された DNA 断片を T4 DNA リガーゼでライゲーションし、そのライゲーション液で E. coli DH5  $\alpha$  を形質転換した。得られた形質転換体を 5 0  $\mu$  g / m l のアンピシリンを含有する LB 寒天培地で培養し、生育してきたコロニーから 6 コロニーを無作為に選抜した。この選抜したコロニーをそれぞれ 5 0  $\mu$  g / m l のアンピシリンを含有する滅菌 LB 培地 ( 2 m l ) に接種し、試験管中で振盪培養した ( 3 0  $^{\circ}$  C 、 2 4 時間 ) 。それぞれの培養菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit ( Qiagen 社製 ) を用いてプラスミドを取り出した。取り出したプラスミドのそれぞれの一部を BamHI と XbaI の 2 種類の制限酵素で二重消化した後、電気泳動することによって、取り出したプラスミドは全て目的とする約 1 8 5 0 b p の DNA 断片が挿入されていることを確認した ( 以下、このプラスミドを以下プラスミド p T r c R S b G 1 2 と記す ) 。

#### 【 0 1 2 2 】

##### ( 4 )

プラスミド p T r c R S b G 1 2 を用いて E. coli HB101 を形質転換した。得られた形質転換体を 0 . 1 m M の IPTG と 5 0  $\mu$  g / m l のアンピシリンとを含有する滅菌 LB 培地 ( 1 0 0 m l ) に接種し、振盪培養した ( 3 0  $^{\circ}$  C 、 1 2 時間 ) 。得られた培養液を遠心分離し、湿菌体 0 . 3 g を得た。



4-ブロモ-3-オキシ酪酸メチル 0.3 g、上記湿菌体 0.3 g、 $\text{NADP}^+$  9 mg、グルコース 750 mg、100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) 15 ml、酢酸ブチル 15 ml を混合し、30℃で7時間攪拌した。なお、攪拌中は反応液の pH が 6.5 ± 0.2 となるように 2 M 炭酸ナトリウム水溶液を徐々に加えた。その後、反応液を遠心分離し、有機層を得た。この有機層を実施例 2 に記載した含量分析条件により含量分析を行ったところ、反応に用いた 4-ブロモ-3-オキシ酪酸メチルの量に対して 4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルは 99% 生成していることがわかった。また、実施例 2 に記載した光学純度測定条件で有機層中の 4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルの光学純度を測定したところ (S) 体が 99% e. e. 以上であった。

さらに得られた有機層を濃縮することにより、粗 (S) - 4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルを得る。

#### 【0123】

##### 【発明の効果】

本発明によれば、(S) - 4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを製造するために優れた触媒能力を有する新規なタンパク質をコードする遺伝子、該タンパク質、及びこれを利用した新規な (S) - 4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法が提供される。

#### 【0124】

##### 「配列表フリーテキスト」

配列番号 8

PCR のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 9

PCR のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 10

PCR のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 11

PCR のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 12

P C R のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー  
配列番号 1 3

P C R のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー  
配列番号 1 4

P C R のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー  
配列番号 1 6

P C R のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー  
配列番号 1 7

P C R のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー  
配列番号 2 0

P C R のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー  
配列番号 2 1

P C R のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー  
配列番号 2 3

P C R のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー  
配列番号 2 4

P C R のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー  
配列番号 2 5

P C R のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー  
配列番号 2 6

P C R のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

【 0 1 2 5 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sumitomo Chemical Co.,Ltd

<120> Reductase gene and Use thereof

<130> P152929

<140>

<141>

<160> 27

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 325

<212> PRT

<213> Penicillium citrinum

<400> 1

Met Ser Asn Gly Lys Thr Phe Thr Leu Ser Asn Gly Val Lys Ile Pro

1

5

10

15

Gly Val Gly Phe Gly Thr Phe Ala Ser Glu Gly Ser Lys Gly Glu Thr

20

25

30

Tyr Thr Ala Val Thr Thr Ala Leu Lys Thr Gly Tyr Arg His Leu Asp

35

40

45

Cys Ala Trp Tyr Tyr Leu Asn Glu Gly Glu Val Gly Glu Gly Ile Arg

50

55

60

Asp Phe Leu Lys Glu Asn Pro Ser Val Lys Arg Glu Asp Ile Phe Val

65

70

75

80

Cys Thr Lys Val Trp Asn His Leu His Arg Tyr Glu Asp Val Leu Trp

85

90

95

Ser Ile Asp Asp Ser Leu Lys Arg Leu Gly Leu Asp Tyr Val Asp Met

100

105

110

Phe Leu Val His Trp Pro Ile Ala Ala Glu Lys Asn Gly Gln Gly Glu

115

120

125

Pro Lys Ile Gly Pro Asp Gly Lys Tyr Val Ile Leu Lys Asp Leu Thr

130

135

140

Glu Asn Pro Glu Pro Thr Trp Arg Ala Met Glu Lys Ile Tyr Glu Asp

145

150

155

160

Arg Lys Ala Arg Ser Ile Gly Val Ser Asn Trp Thr Ile Ala Asp Leu

165

170

175

Glu Lys Met Ser Lys Phe Ala Lys Val Met Pro His Ala Asn Gln Ile

180

185

190

Glu Ile His Pro Phe Leu Pro Asn Glu Glu Leu Val Gln Tyr Cys Phe  
195 200 205

Ser Lys Asn Ile Met Pro Val Ala Tyr Ser Pro Leu Gly Ser Gln Asn  
210 215 220

Gln Val Pro Thr Thr Gly Glu Arg Val Ser Glu Asn Lys Thr Leu Asn  
225 230 235 240

Glu Ile Ala Glu Lys Gly Gly Asn Thr Leu Ala Gln Val Leu Ile Ala  
245 250 255

Trp Gly Leu Arg Arg Gly Tyr Val Val Leu Pro Lys Ser Ser Asn Pro  
260 265 270

Lys Arg Ile Glu Ser Asn Phe Lys Ser Ile Glu Leu Ser Asp Ala Asp  
275 280 285

Phe Glu Ala Ile Asn Ala Val Ala Lys Gly Arg His Phe Arg Phe Val  
290 295 300

Asn Met Lys Asp Thr Phe Gly Tyr Asp Val Trp Pro Glu Glu Thr Ala  
305 310 315 320

Lys Asn Leu Ser Ala  
325

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 978

&lt;212&gt; DNA

<213> *Penicillium citrinum*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(978)

&lt;400&gt; 2

atg tct aac gga aag act ttc aca ttg agc aac ggc gtc aag att cct 48

Met Ser Asn Gly Lys Thr Phe Thr Leu Ser Asn Gly Val Lys Ile Pro

1

5

10

15

ggc gtc ggc ttt ggt acc ttc gct agt gaa ggt tcc aag ggc gag acc 96

Gly Val Gly Phe Gly Thr Phe Ala Ser Glu Gly Ser Lys Gly Glu Thr

20

25

30

tat act gct gtc acc act gcc ctg aag acc ggt tac cgt cac ttg gac 144

Tyr Thr Ala Val Thr Thr Ala Leu Lys Thr Gly Tyr Arg His Leu Asp

35

40

45

tgt gcc tgg tac tac ctg aac gag ggt gag gtt ggt gag ggt atc cgt 192

Cys Ala Trp Tyr Tyr Leu Asn Glu Gly Glu Val Gly Glu Gly Ile Arg

50

55

60

gac ttc ctg aag gag aac ccc tcg gtg aag cgt gag gac atc ttc gtc 240

Asp Phe Leu Lys Glu Asn Pro Ser Val Lys Arg Glu Asp Ile Phe Val

65

70

75

80

tgc acc aag gtg tgg aac cac ctc cac cgt tat gag gac gtc ctc tgg 288

Cys Thr Lys Val Trp Asn His Leu His Arg Tyr Glu Asp Val Leu Trp

85

90

95

tcc att gac gac tcc ctg aag cgt ctt gga ctt gac tac gtt gat atg 336

Ser Ile Asp Asp Ser Leu Lys Arg Leu Gly Leu Asp Tyr Val Asp Met

100

105

110

ttc ctc gtt cac tgg ccc att gct gcc gaa aag aat ggc cag ggt gag 384

Phe Leu Val His Trp Pro Ile Ala Ala Glu Lys Asn Gly Gln Gly Glu

115

120

125

ccc aag att ggc cct gac ggc aaa tac gtc att ctc aag gac ctg acc 432

Pro Lys Ile Gly Pro Asp Gly Lys Tyr Val Ile Leu Lys Asp Leu Thr

130

135

140

gaa aac ccc gag ccc aca tgg cgc gct atg gaa aaa att tat gag gat 480

Glu Asn Pro Glu Pro Thr Trp Arg Ala Met Glu Lys Ile Tyr Glu Asp

145

150

155

160

cgc aag gcc agg tcc att ggt gtc tcc aac tgg acc att gcc gac ctt 528

Arg Lys Ala Arg Ser Ile Gly Val Ser Asn Trp Thr Ile Ala Asp Leu

165

170

175

gaa aaa atg tcc aag ttc gcc aag gtc atg cct cac gcc aac cag atc 576

Glu Lys Met Ser Lys Phe Ala Lys Val Met Pro His Ala Asn Gln Ile

180

185

190

gag att cac ccc ttc ctg ccc aac gag gag ctg gtg cag tac tgc ttc 624

Glu Ile His Pro Phe Leu Pro Asn Glu Glu Leu Val Gln Tyr Cys Phe

195

200

205

tcc aag aac att atg ccc gtg gcc tac tct cct ctg ggc tcg cag aac 672

Ser Lys Asn Ile Met Pro Val Ala Tyr Ser Pro Leu Gly Ser Gln Asn

210

215

220

cag gtt ccc acc acc ggt gag cgg gtc agc gag aac aag act ctg aac 720

Gln Val Pro Thr Thr Gly Glu Arg Val Ser Glu Asn Lys Thr Leu Asn

225

230

235

240

gag atc gcc gag aag ggc ggc aac acc ctt gct cag gtt ctt att gcc 768

Glu Ile Ala Glu Lys Gly Gly Asn Thr Leu Ala Gln Val Leu Ile Ala

245

250

255

tgg ggt ctg cgc cgt ggc tac gtc gtt ctc ccc aag agc tcc aac ccc 816

Trp Gly Leu Arg Arg Gly Tyr Val Val Leu Pro Lys Ser Ser Asn Pro

260

265

270

aag cgc att gag tcc aac ttc aag agc att gag ctc tcc gat gcc gac 864

Lys Arg Ile Glu Ser Asn Phe Lys Ser Ile Glu Leu Ser Asp Ala Asp

275

280

285

ttt gaa gcc atc aat gcc gtt gcc aag ggt cgt cac ttc cgt ttc gtc 912

Phe Glu Ala Ile Asn Ala Val Ala Lys Gly Arg His Phe Arg Phe Val

290

295

300

aac atg aag gat act ttc gga tat gat gtc tgg ccc gag gag acc gcc 960



Asn Met Lys Asp Thr Phe Gly Tyr Asp Val Trp Pro Glu Glu Thr Ala

305 310 315 320

aag aac ctg tct gcg tga

978

Lys Asn Leu Ser Ala

325

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 3

Asn Ile Met Pro Val Ala Tyr Ser Pro Leu Gly Ser Gln Asn Gln Val

1 5 10 15

Pro

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 4

Ile Pro Gly Val Phe Gly Thr Phe Ala Ser

1 5 10

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 5

Ser Ile Glu Leu Ser Asp Ala Asp Phe Glu Ala Ile Asn Ala Val Ala

1

5

10

15

Lys

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 6

Met Ile Gly Val Ala Asn Tyr Thr Ile Ala Asp Leu Glu Lys

1

5

10

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 7

Tyr Glu Asp Val Leu Xaa Xaa Ile Asp Asp Ser Leu Lys Arg

1

5

10

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide primer for PCR

<400> 8

ggaacytgrt tytggswacc

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide primer for PCR

<400> 9

tangcnacng gcataatatt

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide primer for PCR

<400> 10

tangcnacng gcataatgtt

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide primer for PCR

<400> 11

tangcnacng gcatgatatt

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide primer for PCR

<400> 12

tangcnacng gcatgatgtt

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide primer for PCR

<400> 13

tangcnacng gcattatatt

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide primer for PCR

<400> 14

tangcnacng gcattatgtt

20

<210> 15

<211> 697

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 15

cgctctaaaa ctantggatc ccccgggctg caggaattcg gcggcggcgg atccaacgga 60  
aanactttca cactgagcaa cggcgtcaaa attcctggcg tcggcttttg tacctncgct 120  
agtgaagggtt ccaagggcga aacctatnct gctgtcacca ctgccctgaa aaccgggttac 180  
cgtcncttgg actgtgcctg gtactacctg aacaagggtg aggttggtga gggtnntccgt 240  
gacttcctga aggaaaaccc ctcggtgaag cgtgaggaca tcttcgtctg caccaagggtg 300  
tggaaccacc tccaccgtta tgaggacgtc ctctgggtcca ttgacnactc cctgaagcgt 360  
cttggacttg actacgttga tatgttcctc gttcactggc ccattgctgc cgaaaaaaat 420  
ggccagggtg agcccaaaat tggccctgac ggcaaatacn tcnttctcaa ggacctgacc 480  
gaaanccena ncccacctgg cgcgctatgg aaaaaatttn tgangatccc aaggccaggt 540  
ccattggtgt ttccaattgg accattgccg accttgagaa gatgtccaag ttingccaagg 600  
tnatgcctca cgccaaccag atcgagattc accccttctt gcccaacgag gagctgggtgc 660  
agtactgctt ttccaagaac antatgcccc tagcgta 697

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed  
oligonucleotide primer for PCR

<400> 16

ggaggtggtt ccacaccttg g

21

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed  
oligonucleotide primer for PCR

<400> 17

caaccagatc gagattcacc

20

<210> 18

<211> 331

&lt;212&gt; DNA

<213> *Escherichia coli*

&lt;400&gt; 18

cgctctaaaa ctantggatc ccccgggctg caggaattcg gcggccgcgg atccttcac 60  
 cccatcatgt ctaacggaaa gactttcaca ttgagcaacg gcgtcaagat tcctggcgtc 120  
 ggctttggta ccttcgctag tgaaggttcc aaggcgaga cctatactgc tgcaccact 180  
 gccctgaaga ccggttaccg tcacttggac tgtgcctggt actacctgaa cgagggtgag 240  
 gttggtgagg gtatccgtga cttcctgaag gagaaccct cggtgaagcg tgaggacac 300  
 ttcgtctgca ccaagggtg gaaccacctc c 331

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 743

&lt;212&gt; DNA

<213> *Escherichia coli*

&lt;400&gt; 19

caaccagatc gagattcacc ccttcctgcc caacgaggag ctggtgcagt actgcttctc 60  
 caagaacatt atgcccgtgg cctactctcc tctgggctcg cagaaccagg tccccaccac 120  
 cgggtgagcgg gtcagcgaga acaagactct gaacgagatc gccgagaagg gcggcaacac 180  
 ccttgctcag gttcttattg cctgggggtct gcgccgtggc tacgtcgttc tccccaaagag 240  
 ctccaacccc aagcgcatg agtccaactt caagagcatt gagctctccg atgccgactt 300  
 tgaagccatc aatgccgttg ccaagggtcg tcacttccgt ttcgtcaaca tgaaggatac 360  
 tttcgatat gatgtctggc ccgaggagac cgccaagaac ctgtctgcgt gaatctctac 420  
 gaaattataa aatnacaccn acnaaaancc aaagcganag gatgatnccc aaaanttttg 480  
 agggtttctt ggttgaaaac gtttantgan cccgaantga angaatagat gancntgatt 540  
 tctccaaaaa aaaaaaaaaa aaaaacggtc cgcggccgct ccnngggggg gcccggttcc 600  
 caattcnccc cttatnattg aattcttttt taanggggnc aaattcncc nnatttcnt 660



cnaattggn nggccgcctc caaacttten tcntnaaagg gncccaattc ccccccnaatt 720  
aantggantt cctntttacc ttt 743

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed  
origonucleotide primer for PCR

<400> 20

ccaaggtgtg gaaccacctc c 21

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed  
origonucleotide primer for PCR

<400> 21

ccagaggaga gtaggccacg g 21

<210> 22

<211> 417

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 22

```
ccaaggtgtg gaaccacctc caccgttatg aggacgtcct ctggtccatt gacgactccc 60
tgaagcgtct tggacttgac tacgttgata tgttccctcgt tcaactggccc attgctgccg 120
aaaagaatgg ccagggtgag cccaagattg gccctgacgg caaatacgtc attctcaagg 180
acctgaccga aaaccccgag cccacatggc gcgctatgga aaaaatttat gaggatcgca 240
aggccaggtc cattggtgtc tccaactgga ccattgccga ccttgaaaaa atgtccaagt 300
tcgccaaggt catgcctcac gccaccaga tcgagattca ccccttcctg cccaacgagg 360
agctggtgca gtactgcttc tccaagaaca ttatgcccggt ggcctactct cctctgg 417
```

<210> 23

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide primer for PCR

<400> 23

gccatggcta tgtctaacgg aaagact

27

<210> 24

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide primer for PCR

<400> 24

cggatccggtt ataatttcgt agagattca

29

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide primer for PCR

<400> 25

gatcatcata gcaggagtca t

21

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed  
oligonucleotide primer for PCR

<400> 26

gaattcaaca ccagtcagct c

21

<210> 27

<211> 786

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(786)

<400> 27

atg tat aaa gat tta gaa gga aaa gta gtt gtc ata aca ggt tca tct 48

Met Tyr Lys Asp Leu Glu Gly Lys Val Val Val Ile Thr Gly Ser Ser

1

5

10

15

acc ggt tta gga aaa gca atg gcg att cgt ttt gcg aca gaa aaa gct 96

Thr Gly Leu Gly Lys Ala Met Ala Ile Arg Phe Ala Thr Glu Lys Ala

20

25

30

aaa gta gtt gtg aac tat cgt tcg aaa gaa gaa gaa gct aac agc gtt 144

Lys Val Val Val Asn Tyr Arg Ser Lys Glu Glu Glu Ala Asn Ser Val

35

40

45

tta gaa gaa att aaa aaa gtg ggc gga gag gct att gcc gtc aaa ggt 192

Leu Glu Glu Ile Lys Lys Val Gly Gly Glu Ala Ile Ala Val Lys Gly

50

55

60

gat gta aca gtt gag tct gat gtg atc aat tta gtt caa tct gct att 240

Asp Val Thr Val Glu Ser Asp Val Ile Asn Leu Val Gln Ser Ala Ile

65

70

75

80

aaa gaa ttt gga aag cta gac gtt atg att aat aac gca gga atg gaa 288

Lys Glu Phe Gly Lys Leu Asp Val Met Ile Asn Asn Ala Gly Met Glu

85

90

95

aat ccg gtt tcg tct cat gaa atg tct tta agt gat tgg aat aaa gtc 336

Asn Pro Val Ser Ser His Glu Met Ser Leu Ser Asp Trp Asn Lys Val

100

105

110

att gat acg aac tta acg gga gca ttt tta ggc agc cgt gaa gcg att 384

Ile Asp Thr Asn Leu Thr Gly Ala Phe Leu Gly Ser Arg Glu Ala Ile

115

120

125

aaa tat ttt gtg gaa aat gat att aag gga aca gtt att aac atg tcg 432

Lys Tyr Phe Val Glu Asn Asp Ile Lys Gly Thr Val Ile Asn Met Ser

130

135

140

agt gtt cac gag aaa att cct tgg cca tta ttt gtt cat tac gca gca 480

Ser Val His Glu Lys Ile Pro Trp Pro Leu Phe Val His Tyr Ala Ala

145	150	155	160	
agt aaa ggc gga atg aag ctc atg acc gaa aca ctt gca tta gaa tac				528
Ser Lys Gly Gly Met Lys Leu Met Thr Glu Thr Leu Ala Leu Glu Tyr				
	165	170	175	
gct cca aaa ggt att cgt gta aat aac att gga ccg gga gcg att aat				576
Ala Pro Lys Gly Ile Arg Val Asn Asn Ile Gly Pro Gly Ala Ile Asn				
	180	185	190	
aca ccg att aac gct gag aaa ttt gct gat cct gag cag cgt gca gat				624
Thr Pro Ile Asn Ala Glu Lys Phe Ala Asp Pro Glu Gln Arg Ala Asp				
	195	200	205	
gta gaa agc atg att cca atg gga tac att gga gag ccg gaa gaa att				672
Val Glu Ser Met Ile Pro Met Gly Tyr Ile Gly Glu Pro Glu Glu Ile				
	210	215	220	
gca gcg gtt gct gca tgg cta gct tct tca gag gca agt tat gta aca				720
Ala Ala Val Ala Ala Trp Leu Ala Ser Ser Glu Ala Ser Tyr Val Thr				
225	230	235	240	
ggg att aca ctc ttt gct gac ggc ggt atg aca cag tac cca tca ttc				768
Gly Ile Thr Leu Phe Ala Asp Gly Gly Met Thr Gln Tyr Pro Ser Phe				
	245	250	255	
caa gca gga cgc gga taa				786
Gln Ala Gly Arg Gly				
	260			

<210> 28

<211> 996

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(978)

<400> 28

atg tct aac gga aag act ttc aca ttg agc aac ggc gtc aag att cct 48

Met Ser Asn Gly Lys Thr Phe Thr Leu Ser Asn Gly Val Lys Ile Pro

1

5

10

15

ggc gtc ggc ttt ggt acc ttc gct agt gaa ggt tcc aag ggc gag acc 96

Gly Val Gly Phe Gly Thr Phe Ala Ser Glu Gly Ser Lys Gly Glu Thr

20

25

30

tat act gct gtc acc act gcc ctg aag acc ggt tac cgt cac ttg gac 144

Tyr Thr Ala Val Thr Thr Ala Leu Lys Thr Gly Tyr Arg His Leu Asp

35

40

45

tgt gcc tgg tac tac ctg aac gag ggt gag gtt ggt gag ggt atc cgt 192

Cys Ala Trp Tyr Tyr Leu Asn Glu Gly Glu Val Gly Glu Gly Ile Arg

50

55

60

gac ttc ctg aag gag aac ccc tcg gtg aag cgt gag gac atc ttc gtc 240

Asp Phe Leu Lys Glu Asn Pro Ser Val Lys Arg Glu Asp Ile Phe Val  
 65 70 75 80

tgc acc aag gtg tgg aac cac ctc cac cgt tat gag gac gtc ctc tgg 288  
 Cys Thr Lys Val Trp Asn His Leu His Arg Tyr Glu Asp Val Leu Trp  
 85 90 95

tcc att gac gac tcc ctg aag cgt ctt gga ctt gac tac gtt gat atg 336  
 Ser Ile Asp Asp Ser Leu Lys Arg Leu Gly Leu Asp Tyr Val Asp Met  
 100 105 110

ttc ctc gtt cac tgg ccc att gct gcc gaa aag aat ggc cag ggt gag 384  
 Phe Leu Val His Trp Pro Ile Ala Ala Glu Lys Asn Gly Gln Gly Glu  
 115 120 125

ccc aag att ggc cct gac ggc aaa tac gtc att ctc aag gac ctg acc 432  
 Pro Lys Ile Gly Pro Asp Gly Lys Tyr Val Ile Leu Lys Asp Leu Thr  
 130 135 140

gaa aac ccc gag ccc aca tgg cgc gct atg gaa aaa att tat gag gat 480  
 Glu Asn Pro Glu Pro Thr Trp Arg Ala Met Glu Lys Ile Tyr Glu Asp  
 145 150 155 160

cgc aag gcc agg tcc att ggt gtc tcc aac tgg acc att gcc gac ctt 528  
 Arg Lys Ala Arg Ser Ile Gly Val Ser Asn Trp Thr Ile Ala Asp Leu  
 165 170 175

gaa aaa atg tcc aag ttc gcc aag gtc atg cct cac gcc aac cag atc 576  
 Glu Lys Met Ser Lys Phe Ala Lys Val Met Pro His Ala Asn Gln Ile



180	185	190	
gag att cac ccc ttc ctg ccc aac gag gag ctg gtg cag tac tgc ttc			624
Glu Ile His Pro Phe Leu Pro Asn Glu Glu Leu Val Gln Tyr Cys Phe			
195	200	205	
tcc aag aac att atg ccc gtg gcc tac tct cct ctg ggc tcg cag aac			672
Ser Lys Asn Ile Met Pro Val Ala Tyr Ser Pro Leu Gly Ser Gln Asn			
210	215	220	
cag gtt ccc acc acc ggt gag cgg gtc agc gag aac aag act ctg aac			720
Gln Val Pro Thr Thr Gly Glu Arg Val Ser Glu Asn Lys Thr Leu Asn			
225	230	235	240
gag atc gcc gag aag ggc ggc aac acc ctt gct cag gtt ctt att gcc			768
Glu Ile Ala Glu Lys Gly Gly Asn Thr Leu Ala Gln Val Leu Ile Ala			
245	250	255	
tgg ggt ctg cgc cgt ggc tac gtc gtt ctc ccc aag agc tcc aac ccc			816
Trp Gly Leu Arg Arg Gly Tyr Val Val Leu Pro Lys Ser Ser Asn Pro			
260	265	270	
aag cgc att gag tcc aac ttc aag agc att gag ctc tcc gat gcc gac			864
Lys Arg Ile Glu Ser Asn Phe Lys Ser Ile Glu Leu Ser Asp Ala Asp			
275	280	285	
ttt gaa gcc atc aat gcc gtt gcc aag ggt cgt cac ttc cgt ttc gtc			912
Phe Glu Ala Ile Asn Ala Val Ala Lys Gly Arg His Phe Arg Phe Val			
290	295	300	

aac atg aag gat act ttc gga tat gat gtc tgg ccc gag gag acc gcc 960  
 Asn Met Lys Asp Thr Phe Gly Tyr Asp Val Trp Pro Glu Glu Thr Ala  
 305 310 315 320

aag aac ctg tct gcg tga atctctacga aattataa 996  
 Lys Asn Leu Ser Ala  
 325

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを製造する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子を見出し、これを利用した4-ハロ-3-オキソ酪酸エステルを不斉還元して(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの新規な製造法を提供すること。

【解決手段】

4-ブロモ-3-オキソ酪酸メチルを不斉還元して(S)-4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルを優先的に生産する能力を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子及びその利用による。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002093]

1. 変更年月日 1990年 8月28日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号  
氏 名 住友化学工業株式会社